

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

---



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 42 146.3

**Anmeldetag:** 04. September 2002

**Anmelder/Inhaber:** Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Universitätsklinikum, Tübingen/DE

**Bezeichnung:** Antikörper zur Identifizierung und/oder Isolierung  
von hämatopoetischen Stammzellen

**IPC:** C 07 K, C 12 N, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 28. Juli 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Anmelder:

02. September 2002

5402P227 HO/GL-sm

Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Universitätsklinikum  
Geissweg 3

D-72076 Tübingen

Antikörper zur Identifizierung und/oder Isolierung von  
hämatopoetischen Stammzellen

Die vorliegende Erfindung betrifft einen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment davon zur Isolierung und/oder Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen.

Mit dem Begriff "Stammzelle" wird allgemein jede noch nicht ausdifferenzierte Zelle bezeichnet, die die Fähigkeit besitzt, sowohl identische Nachkommen zu produzieren als auch sich in spezifische Entwicklungslinien zu differenzieren.

Adulte Stammzellen haben die Funktion, die Homöostase der Zellzahl in dem betreffenden Gewebe aufrechtzuerhalten, d.h.,

abgestorbene Zellen zu ersetzen. Daher sind Stammzellen insbesondere in Geweben, die hohen Belastungen ausgesetzt sind, zu finden. Adulte Stammzellen sind in den verschiedensten Geweben und Organen gefunden worden, wie bspw. in Knochenmark, Gehirn, Leber, Haut, Darm, Hornhaut usw.

Hämatopoetische Stammzellen erzeugen im Knochenmark fortlaufend neue Zellen, da diese - aufgrund der limitierten Lebensdauer der meisten Zellen - ständig im Blut benötigt werden.

Ausgang der Blutbildung ist die pluripotente, undifferenzierte hämatopoetische Stammzelle, die noch nicht für eine spezielle Funktion determiniert ist. Bei der Differenzierung von Stammzellen entstehen zunächst Vorstufen, die sich nicht selbst erneuern können und nur einen spezialisierten Zelltyp zur Ausreifung bringen. Weder die pluripotente Stammzelle noch die verschiedenen Zwischenstufen sind in der Lage, zellspezifische hämatopoetische Funktionen zu erfüllen; dies vermögen erst die ausgereiften Zellen. Vorläuferzellen, die einen bestimmten Differenzierungsweg eingeschlagen haben, halten diesen auch bis zur Reifung durch ("commitment").

Da wie erwähnt hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark fortlaufend neue Zellen erzeugen, koexistieren Stammzellen gleichzeitig mit den Vorläuferzellen im Knochenmark. Dort liegen die Zellen in einem komplexen Arrangement vor, weshalb es schwierig ist, seltene Zellen zu identifizieren. Stammzellen und deren direkte Nachkommen exprimieren einen nahezu identischen Phänotyp. Aus diesen Gründen ist es auch nicht möglich, eine ultimative Stammzelle allein durch sichtbare Merkmale zu identifizieren.

Die Frequenz von Stammzellen im Knochenmark beträgt  $1 \times 10^{-5}$  bis  $1 \times 10^{-6}$ . Außerdem sind die Stammzellen im betreffenden Gewebe in der Regel weit verstreut, so daß sie schwer aufzufinden sind.

Unter bestimmten Bedingungen teilen sich - wie oben erwähnt - hämatopoetische Stammzellen in Vorläuferzellen, deren weitere Differenzierung teilweise bereits determiniert ist. In Abhängigkeit von Art und Menge der vorliegenden Cytokine können diese myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen wiederum verschiedene andere Vorläuferzellen generieren, die jedoch nicht mehr dazu fähig sind, sich selbst zu erneuern. Beispiele für Cytokine, die die Hämatopoese regulieren, sind z.B. der Granulocytenkolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), der Makrophagenkolonie-stimulierende Faktor (M-CSF), mehrere Interleukine, der Stammzellfaktor (SCF), Erythropoietin (EPO) etc.

Um das hämatopoetische (blutbildende) Potential von Stammzellen zu untersuchen, werden in Frage kommende menschliche Zellpopulationen in immundefiziente Mäuse (NOD/SCID-Mäuse) transplantiert. Handelt es sich bei den transplantierten Zellen um Stammzellen, dann ist neben der murinen auch eine menschliche Hämatopoese nachzuweisen. Dieses *in-vivo*-Assay dient zur Charakterisierung und Identifizierung von Stammzellen, und zwar indem die Nachkommenschaft von einzelnen Zellen analysiert wird.

Hämatopoetische Stammzellen besitzen vor diesem Hintergrund ein großes therapeutisches Potential und werden bei Patienten mit einem geschwächten oder vollständig zerstörtem Immunsystem eingesetzt.

Hämatopoetische Stammzellen können beispielsweise aus dem Knochenmark mittels FACS (fluorescence-activated cell sorter) gereinigt werden. Diese Reinigung hängt von der Anwesenheit von bestimmten Zelloberflächenproteinen ab, die die hämatopoetischen Stammzellen und die Vorläuferzellen von anderen Zellarten unterscheiden, und von der Abwesenheit von anderen Zelloberflächenproteinen auf den Stammzellen, wobei diese Proteine dann für differenzierte hämatopoetische Zellen charakteristisch sind. Jedes der Oberflächenproteine bindet einen unterschiedlichen monoklonalen Antikörper, der jeweils mit einem unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoff konjugiert ist, wodurch mittels FACS diese Zellen getrennt werden können.

Insbesondere der Zelloberflächenmarker CD34 ist in der Vergangenheit verwendet worden, um hämatopoetische Stammzellen zu isolieren.

In letzter Zeit sind ferner Antikörper gegen das Antigen CD133 genutzt worden, um hämatopoetische Stammzellen zu charakterisieren. Miraglia et al., "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization and molecular cloning", Blood 90:5013-5021, (1997), konnten von diesem Antigen zeigen, daß es ein 120 kDa-Glycoprotein mit fünf Transmembran-Domänen ist, das nicht nur auf hämatopoetischen Stammzellen und deren Progenitoren, sondern auch auf neuronalen und endothelialen Stammzellen exprimiert ist.

CD133 Antikörper werden neben den herkömmlichen CD34 Antikörpern für die positive Selektion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen im klinischen Maßstab eingesetzt. CD133 wird nur auf CD34<sup>bright</sup>-(hohe Fluoreszenz-Intensität)Stamm- und Vor-

läuferzellen exprimiert. CD34<sup>bright</sup> CD133 positive Zellen sind hauptsächlich negativ für andere erythroide Vorläuferzellmarker wie beispielsweise CD36 und Glycophorin A. In CD133-positiven Fraktionen von menschlichem Knochenmark und peripherem Blut konnte neben Stammzellen, die im NOD/SCID-Mausmodell eine menschliche Hämatopoese induzierten, die Mehrzahl an Granulocyten/Makrophagenvorläufern gefunden werden.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen neuen monoklonalen Antikörper bereitzustellen, mit dem selektiv hämatopoetische Stammzellen isoliert bzw. charakterisiert werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch einen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment davon gelöst, wobei der Antikörper oder das Fragment davon an ein gleiches Antigen bindet wie ein Antikörper, der von den bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) unter den Nummern DSM ACC2569, DSM ACC2566, DSM ACC2565 am 14.08.2002 und DSM ACC2551 am 12.07.2002 nach dem Budapester Vertrag hinterlegten Hybridomzelllinien CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 produziert wird.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird auf diese Weise vollständig gelöst.

Die Erfinder konnten in eigenen Versuchen zeigen, daß es mit den neuen erfindungsgemäßen Antikörpern möglich ist, selektiv hämatopoetische Stammzellen zu isolieren und zu charakterisieren. Die neuen Antikörper erwiesen sich darüber hinaus auch als in ähnlichem Maße sensitiv wie ein Antikörper gegen CD133.

Die Erfindung betrifft insbesondere monoklonale Antikörper oder Fragmente davon, die von den Hybridomzelllinien CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 produziert werden.

Die Erfinder konnten die Antikörper überraschenderweise mit Hilfe des Antigens CDCP1 gewinnen.

CDCP1 ist ein Plasmamembran-Protein mit drei potentiellen "CUB"-Domänen. Diese sind Immunglobulin-ähnliche Domänen, die nach den Anfangsbuchstaben der ersten drei identifizierten Moleküle mit solchen Domänen bezeichnet wurden. Von Proteinen mit solchen Domänen ist bekannt, daß sie bevorzugt im Embryonalstadium und in frühen Entwicklungsstadien exprimiert werden.

Das dieses Protein CDCP1 ("CUB-domain containing protein") kodierende Gen wurde von Scherl-Mostageer et al., "Identification of a novel gene, CDCP1, overexpressed in human colorectal cancer", Oncogene 20: 4402-4408, (2001) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß in Krebsarten bzw. Tumoren wie Darmkrebs und Lungenkrebs dieses Protein, bzw. dessen mRNA stark überexprimiert ist. Aufgrund seiner dreidimensionalen Struktur wurde es als Transmembran-Protein mit drei CUB-Domänen im extrazellulären Raum identifiziert, von dem vorgeschlagen wurde, daß es insbesondere bei der Zelladhäsion oder Interaktion mit der extrazellulären Matrix beteiligt ist (siehe Scherl-Mostageer et al.).

Einen Hinweis, daß dieses Protein insbesondere auch auf primitiven hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und peripheren Blut exprimiert wird, ist hier jedoch weder beschrieben noch nahegelegt.



Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann statt des jeweils angesprochenen Antikörpers auch ein Fragment des Antikörpers verwendet werden, ohne daß dies jeweils ausdrücklich erwähnt wird. Unter "Fragment" wird dabei jedes Fragment des Antikörpers verstanden, das die Antigenbindungsfunktion des Antikörpers beibehält. Solche Fragmente sind bspw.  $F_{ab}$ ,  $F_{(ab)2}$ ,  $F_v$  und andere Fragmente wie z. B. CDR ("complementarity determining region", hypervariable Region) - Fragmente. Die genannten Fragmente weisen die Bindungsspezifität des Antikörpers auf und können auch bspw. mit bekannten Verfahren rekombinant hergestellt werden.

Die Erfinder konnten zeigen, daß es mit den gegen das Plasmamembran-Protein CDCP1 gerichteten Antikörpern unerwarteterweise möglich ist, selektiv hämatopoetische Stammzellen zu charakterisieren und zu isolieren.

Bei der Identifizierung der hämatopoetischen Stammzellen mit diesen neuen Antikörpern zeigte sich, daß die Antikörper eine bessere Selektivität aufwiesen als Antikörper, die gegen CD34 gerichtet sind, und daß sie ähnlich selektiv sind wie der gegen CD133 gerichtete Antikörper.

Daher bieten die neuen Antikörper oder Fragmente derselben bei der Identifizierung oder Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen vorteilhafte Alternativen zu dem CD34-Antikörper.

Solche monoklonalen Antikörper können nach herkömmlichen Methoden hergestellt werden (siehe Köhler und Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", Nature 256:495-497, (1975)). Demnach wird ein Tier mit einem Antigen immunisiert, die Antikörper-produzierenden Zellen

aus dem Tier gewonnen und diese Antikörper-produzierenden Zellen mit einer immortalen Zelllinie fusioniert. Die resultierenden Hybridomzelllinien werden danach gescreent, ob sie in der Lage sind, einen Antikörper gegen das Antigen zu produzieren, das für die Immunisierung eingesetzt wurde.

Die erfindungsgemäßen Antikörper ermöglichen es jetzt auch, weitere Antikörper herzustellen, die an das gleiche Antigen binden. Durch die erfindungsgemäßen Antikörper ist es möglich, die entsprechenden Antigenstrukturen mit allgemein bekannten Verfahren zu isolieren und weitere monoklonale Antikörper gegen die gleichen Antigenstrukturen zu entwickeln, wobei auch hier die bekannten Verfahren Anwendung finden.

Die Erfindung betrifft ferner Hybridomzelllinien, die die Fähigkeit aufweisen, derartige Antikörper zu produzieren und freizusetzen, und insbesondere die Hybridomzelllinien CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4.

Die Erfinder haben mit den neuen Antikörpern erstmals monoklonale Antikörper sowie diese produzierende und freisetzende Hybridomzelllinien bereitgestellt, die eine gezielte Erkennung von hämatopoetischen Zellen ermöglichen, die das Antigen CDCP1 exprimieren. Die Antikörper stellen somit ein bisher einzigartiges und vielseitig einsetzbares Mittel für den Arzt und Forscher dar, um einerseits derartige Zellen nachzuweisen und um andererseits diese Zellen ggf. zu manipulieren, entweder durch die Antikörper selbst oder durch daran gekoppelte Reagenzien.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Isolierung und/oder Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen, mit

einem Antikörper oder einem Fragment davon, wobei der Antikörper oder das Fragment davon an ein gleiches Antigen bindet wie ein Antikörper, der von den bei der DSMZ unter den Nummern DSM ACC2569, DSM ACC2566, DSM ACC2565 am 14.08.2002 und DSM ACC2551 am 12.07.2002 nach dem Budapester Vertrag hinterlegten Hybridomzelllinien CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 produziert wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, gezielt und selektiv hämatopoetische Stammzellen zu identifizieren und/oder zu isolieren, insbesondere Zellen innerhalb der CD34<sup>+bright</sup>-Population.

In einer weiteren Ausführungsform wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ein Antikörper oder ein Fragment von einem Antikörper verwendet, der von den Hybridomzelllinien CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 produziert wird.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen mit einem Antikörper, mit den folgenden Schritten:

- (a) in Verbindung bringen einer Probe einer Zellsuspension, die hämatopoetische Stammzellen enthält, mit dem neuen monoklonalen Antikörper, oder einem Fragment davon, und
- (b) Isolieren der mit dem neuen monoklonalen Antikörper oder der mit dem Fragment davon verbundenen Zellen von den Zellen, die diesen neuen monoklonalen Antikörper, oder das Fragment davon, nicht binden.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen mit einem Antikörper, mit den folgenden Schritten:

- (a) in Verbindung bringen einer Probe einer Zellsuspension, die hämatopoetische Stammzellen enthält, mit dem neuen monoklonalen Antikörper, oder einem Fragment davon, und
- (b) Identifizieren der Zellen, die an den neuen monoklonalen Antikörper, oder ein Fragment davon, binden in der Probe.

Das in Verbindung bringen einer Zellmischung mit dem Antikörper kann dabei in Lösung vollzogen werden, wie es bspw. bei Anwendung eines Durchflußzytometer (= fluorescent-activated cell sorter (FACS)) der Fall ist.

Allgemein dargestellt, werden bei der Durchflußzytometrie Zellen mit Antikörpern beladen, die einerseits spezifisch für ein Oberflächenmarker und andererseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Diejenigen Zellen, die Marker-positiv sind, fluoreszieren, während die negativen Zellen dunkel bleiben. Es kann also festgestellt werden, welcher Anteil einer Zellpopulation Marker-positiv ist. Gleichzeitig erlaubt ein Durchflußzytometer, die Größe und Granularität von Zellen zu erfassen.

Eingesetzt werden kann auch ein Verfahren zur magnetischen Zellseparation (MACS, magnetic cell sorting). Bei diesem Verfahren werden die Zellen mit magnetischen Beads markiert, wobei diese Beads bspw. an die Antikörper gekoppelt sein können.

Ferner kann das in Verbindung bringen auch dadurch durchgeführt werden, daß der monoklonale Antikörper an einem Träger immobilisiert wird, wie es bspw. bei der Säulenchromatographie der Fall ist.

Die Zellsuspension kann irgendeine Lösung mit Knochenmarkzellen, Blut- oder Gewebezellen sein.

Nach Mischen der Zellsuspension mit dem Antikörper binden diejenigen Zellen den Antikörper, die das Antigen CDCP1 exprimieren, woraufhin diese Zellen von den Zellen, die keinen Antikörper gebunden haben, nach den beschriebenen Verfahren identifiziert und/oder isoliert werden können.

Die auf diese Weise isolierten hämatopoetischen Stammzellen können dann dazu eingesetzt werden, um durch Transplantation bei immunsupprimierten oder immundefekten Patienten eine Repopularisierung des Knochenmarks zu bewirken.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der neuen Antikörper, oder Fragmenten davon, zur Isolierung und/oder Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung des Proteins CDCP-1 und/oder der Nukleinsäure, die das Protein CDCP-1 kodiert, zur Herstellung von Antikörpern oder Fragmenten davon zur Isolierung und/oder Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen.

Die Erfindung betrifft ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend zumindest einen neuen Antikörper oder Fragmente davon.

Zusätzlich zu dem Antikörper, der den Wirkstoff der Zusammensetzung darstellt, kann diese Zusammensetzung auch geeignete Puffer, Verdünnungsmittel oder Additive enthalten. Geeignete Puffer schließen bspw. Tris-HCl, Glycin und Phosphat mit ein, geeignete Verdünnungsmittel bspw. wäßrige NaCl-, Lactose-, Mannitol- Lösungen. Geeignete Additive schließen bspw. Detergentien, Lösungsmittel, Antioxidantien und Konservierungsstoffe mit ein. Eine Übersicht der für derartige Zusammensetzungen verwendbaren Substanzen ist z.B. gegeben in: A. Kibbe, "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3. Ed., 2000, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press.

Die Erfindung betrifft ferner ein Kit, das zumindest einen neuen Antikörper oder Fragmente davon enthält.

Weitere Vorteile ergeben sich aus den beigefügten Figuren und der Beschreibung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in Alleinstellung oder in anderen Kombinationen verwendet werden können, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Ausführungsbeispiele sind in den beigefügten Zeichnungen dargestellt und werden in der Beschreibung näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1a die Reaktivität der erfindungsgemäßen Antikörper mit Wildtypzellen;

Fig. 1b die Reaktivität der erfindungsgemäßen Antikörper mit Transfektanten;

Fig. 2a die Koexpression von CD34 und CDCP1 auf Knochenmark-Zellpopulationen (Markierung der Zellen mit CD34-FITC) und CDCP1-PE (CUB1));

Fig. 2b die Darstellung von Knochenmarkzellen im Plot CD34 versus CD38 und die "Gate"-Setzung um die Stammzellpopulation (Markierung von Knochenmark-Zellpopulationen mit CD38-FITC, CDCP1-PE, CD34-PerCP und CD133-APC); und

Fig. 2c die Koexpression von CDCP1 und CD133 auf CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Knochenmark-Stammzellen.

### Beispiel

#### Herstellung von Transfektanten

Ausgehend von dem Klonierungsvektor pBluescript II SK(+), in den der kodierende Bereich von humanem CDCP1 kloniert wurde (erhalten von Boehringer Ingelheim/Wien), wurde die kodierende Sequenz in einen pRK-Vektor (PharMingen, San Diego, USA) umkloniert und dabei C-terminal ein fünffaches myc-Epitop (13 Aminosäuren des c-myc Proteins) angehängt. Die pRK-CDCP1-myc5 DNA wurde zusammen mit einem Puromycinresistenzplasmid (pSVpacΔp: de la Luna et al., "Efficient Transformation of mammalian cells

with constructs containing a puromycin-resistance marker", Gene, 62(1): 121-126, 1988) nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode in NIH-3T3 Maus-Zellen kotransfiziert.

Nach Klonierung einzelner puromycinresistenter Zellen wurde die Expression des CDCDP1-myc5 Proteins in den transfizierten Zellen durch Western-Blot mittels eines anti-myc Antiserums nachgewiesen. Anschließend wurde der Klon NIH-3T3/huCDCP1 ausgewählt.

#### Immunisierung

Zwei Balb/c-Mäuse wurden nach Standardprotokoll vier Mal mit ca.  $5 - 10 \times 10^6$  NIH-3T3/huCDCP1 Zellen intraperitoneal immunisiert. Drei bis vier Tage nach der letzten Immunisierung wurde die Milz entnommen und die Milzzellen mit SP2/0 Myelomzellen nach Standardprotokoll fusioniert. Die Zellkulturüberstände von wachsenden, HAT-resistenten Hybridomzellen wurden sowohl auf der Transfektanten als auch auf den Wildtypzelllinien (NIH-3T3) mittels FACS-Analyse getestet.

Überstände, die selektiv mit der Transfektanten, nicht jedoch mit der Wildtypzelllinie NIH-3T3 reagierten, wurden als spezifisch für CDCP1 gewertet. Die entsprechenden Hybridomzellen wurden kloniert (limiting dilution) und positive Klone selektiert. Es wurden vier Klone erhalten (CUB1, CUB2, CUB3, CUB4), die selektiv mit NIH-3T3/huCDCP1 Zellen reagierten (Isotypen: ein IgG2b [CUB1], drei IgG2a [CUB2-4]).

In Fig. 1a wird durch die Histogramme gezeigt, daß die vier Antikörper nicht mit der Wildtypzelle reagieren. In Fig. 1b sind



Histogramme dargestellt, in denen die Reaktivität der vier Antikörper CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 mit der Transfektanten durch jeweils den zweiten, dunklen Peak klar wiedergegeben ist.

Untersuchung der Reaktivität der Antikörper auf peripheren Blutzellen

Zunächst wurde die Reaktivität der Antikörper auf peripheren Blutzellen getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Reaktivität des CDCP1-spezifischen Antikörpers CUB1 auf peripheren Blutzellen

Zelltyp	Reaktivität
T-Lymphozyten (CD3 <sup>+</sup> )	-
B-Lymphozyten (CD20 <sup>+</sup> )	-
NK-Zellen (CD56 <sup>+</sup> )	-
Monozyten (CD14 <sup>+</sup> )	-
Neutrophile Granulozyten (CD15 <sup>+</sup> )	-
Eosinophile Granulozyten (Siglec-8 <sup>+</sup> )	-
Basophile Granulozyten (CD203c <sup>+</sup> )	-
Erythrozyten (CD235a <sup>+</sup> )	-
Thrombozyten (CD61 <sup>+</sup> )	-

Es zeigte sich, daß CD3<sup>+</sup> T-Lymphocyten, CD20<sup>+</sup> B-Lymphocyten, CD56<sup>+</sup> NK-Zellen, CD14<sup>+</sup> Monocyten, neutrophile Granulocyten, Siglec-8<sup>+</sup> eosinophile Granulocyten, CD235a<sup>+</sup> Erythrocyten und CD61<sup>+</sup> Thrombocyten negativ für CDCP1 waren.

In der folgenden Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Reaktivität der Antikörper auf verschiedene Zelllinien, die in der Waage-rechten aufgeführt sind, dargestellt. Die vier getesteten Antikörper CUB1 bis CUB4 sind in der Senkrechten aufgeführt.

Tabelle 2: Reaktivität der CDCP1-spezifischen Antikörper CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 auf verschiedene Zelllinien

	CD34- Tf*	CD133- Tf*	K-562	WERI-RB-1	BV-173	HEL	HL-60	KU-812	Hep-G2	MOLT-4
CUB1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CUB2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CUB3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CUB4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

\*Tf = Transfektante

(Beschreibung der Zelllinien:

K-562: Erythroleukämie; WERI-RB-1: Retinoblastom; BV-173: Pro-B-Zellen Leukämie; HEL: Erythroleukämie; HL-60: promyelozytische Leukämie; KU-812: basophile Leukämie; HepG2: hepatozelluläres Karzinom; MOLT-4: T-Lymphocytäre Leukämie).

Es zeigte sich, daß bis auf K-562 alle getesteten Zelllinien negativ für CDCP1 waren. Scherl-Mostageer et al. zeigten bereits, daß CDCP1 mRNA von K-562, einer erythroleukämischen Zelllinie, exprimiert wird.

#### Untersuchung der Reaktivität der Antikörper auf Knochenmarkzellen

Anschließend wurde die Reaktivität des Antikörpers mit Knochenmark-Zellpopulationen untersucht. Es stellte sich heraus, daß CDCP1 exklusiv auf CD34<sup>+</sup> Stammzellen exprimiert ist und nicht auf anderen Populationen (siehe Fig. 2a). Die mittels FACS sortierte CDCP1<sup>+</sup> Fraktion enthielt fast ausschließlich unreife Blasten und unreife Kolonien: CFU-GM ("colony-forming unit-granulocyte macrophage"), BFU-E ("burst-forming unit-erythroid") CFU-GEMM ("Colony-forming Unit Granulocyte-Erythroid-Makrophage-Megakaryocyte").

In Fig. 2b und 2c sind die Ergebnisse einer Vierfarbenanalyse von Knochenmarkzellen dargestellt.

Für die Durchführung der Vierfarbenanalyse wurden die Zellen mit folgenden Antikörperkonjugaten markiert: CUB1-PE (Phycoerythrin), CD133-APC (Allophycocyanin), CD38-FITC (Fluoreszin Isothiocyanat), CD34-PerCP (Peridin Chlorophyll A Protein).

Im Plot der Fig. 2b ist CD34 gegen CD38 aufgetragen. Stammzellen findet man in der seltenen CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Fraktion (Terstappen und Huang "Analysis of bone marrow stem cell", Blood Cells

20(1): 45-61, 1994). Im Plot der Fig. 2b wurde um diese Population ein Fenster ("R2") gesetzt.

Im Plot der Fig. 2c ist CDCP1 gegen CD133 aufgetragen. Hier sind die Zellen dargestellt, die im Fenster "R2" des Plots aus Fig. 2b zu sehen sind. Fig. 2c zeigt, daß im Wesentlichen alle CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Stammzellen CDCP1 und CD133 koexprimieren.

In weiteren Versuchen konnten die Erfinder nachweisen, daß sich nach einer Transplantation von CDCP1-positiven Zellen in NOD/SCID-Mäuse nach 6 Wochen menschliche CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark der Mäuse gebildet hatten. (CD45<sup>+</sup> ist ein Marker für hämatopoetische Zellen.) Somit besitzen die mittels der neuen Antikörper isolierten Zellen erwiesenermaßen die Eigenschaft zur Hämatopoese.

Diese Daten zeigen daher zusammengefaßt, daß CDCP1 ein neuer Marker für hämatopoetische Stammzellen ist. Mittels des erfindungsgemäßen Antikörpers gegen diesen Marker können CDCP1-exprimierende Stammzellen einfach selektiert und anschließend bspw. zur Repopularisierung transplantiert werden. Dem erfindungsgemäßen Antikörper kommt demnach eine äußerst wichtige Bedeutung bei der Selektion von hämatopoetischen Stammzellen zu, er stellt eine ausgezeichnete Alternative gegenüber den für eine Stammzellselektion geläufigen Markern CD133 und CD34 dar.

Patentansprüche

1. Monoklonaler Antikörper oder Fragmente davon zur Isolierung und/oder Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper oder ein Fragment davon an ein gleiches Antigen bindet wie ein Antikörper, der von den bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) unter den Nummern DSM ACC2569, DSM ACC2566, DSM ACC2565 am 14.08.2002 und DSM ACC2551 am 12.07.2002 nach dem Budapester Vertrag hinterlegten Hybridomzelllinien CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 produziert wird.
2. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper von der Hybridomzelle CUB1 produziert wird, die bei der DSMZ unter der Nummer DSM ACC2569 hinterlegt ist.
3. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper von der Hybridomzelle CUB2 produziert wird, die bei der DSMZ unter der Nummer DSM ACC2566 hinterlegt ist.
4. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper von der Hybridomzelle CUB3 produziert wird, die bei der DSMZ unter der Nummer DSM ACC2565 hinterlegt ist.

5. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper von der Hybridomzelllinie CUB4 produziert wird, die bei der DSMZ unter der Nummer DSM ACC2551 hinterlegt ist.
6. Hybridomzelllinie, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5 produziert.
7. Verfahren zur Isolierung und/oder Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen mit einem Antikörper oder einem Fragment davon, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper oder ein Fragment davon verwendet wird, der an ein gleiches Antigen bindet wie ein Antikörper, der von den bei der DSMZ unter den Nummern DSM ACC2569, DSM ACC2566, DSM ACC2565 am 14.08.2002 und DSM ACC2551 am 12.07.2002 hinterlegten Hybridomzelllinien CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 produziert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper verwendet wird, der von den bei der DSMZ unter den Nummern DSM ACC2569, DSM ACC2566, DSM ACC2565 am 14.08.2002 und DSM ACC2551 am 12.07.2002 hinterlegten Hybridomzelllinien CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 produziert wird.
9. Verfahren zur Isolierung von hämatopoetischen Stammzellen mit einem Antikörper, mit den folgenden Schritten:
  - (a) in Verbindung bringen einer Probe einer Zellsuspension, die hämatopoetische Stammzellen enthält, mit einem monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder einem Fragment davon, und

- (b) Isolieren der mit dem monoklonalen Antikörper oder dem Fragment davon verbundenen Zellen von den Zellen, die diesen Antikörper oder das Fragment davon nicht binden.
- 10. Verfahren zur Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen mit einem Antikörper, mit den folgenden Schritten:
  - (a) in Verbindung bringen einer Probe einer Zellsuspension, die hämatopoetische Stammzellen enthält, mit einem monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder einem Fragment davon,
  - (b) Identifizieren der mit dem monoklonalen Antikörper oder dem Fragment davon verbundenen Zellen in der Probe.
- 11. Verwendung von Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder Fragmenten davon zur Isolierung und/oder Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen.
- 12. Verwendung des Proteins CDCP-1 und/oder der Nukleinsäure, die das Protein CDCP-1 kodiert, zur Herstellung von Antikörpern oder Fragmenten davon zur Isolierung und/oder Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen.
- 13. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend zumindest einen monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder Fragmente davon.
- 14. Kit, enthaltend zumindest einen monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder Fragmente davon.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper oder Fragmente davon zur Isolierung und/oder Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen. Die Antikörper oder Fragmente davon binden dabei an ein gleiches Antigen wie ein Antikörper, der von den bei der DSMZ unter den Nummern DSM ACC2569, DSM ACC2566, DSM ACC2565 am 14.08.2002 und DSM ACC2551 am 12.07.2002 hinterlegten Hybridomzelllinien CUB1, CUB2, CUB3 und CUB4 produziert wird.



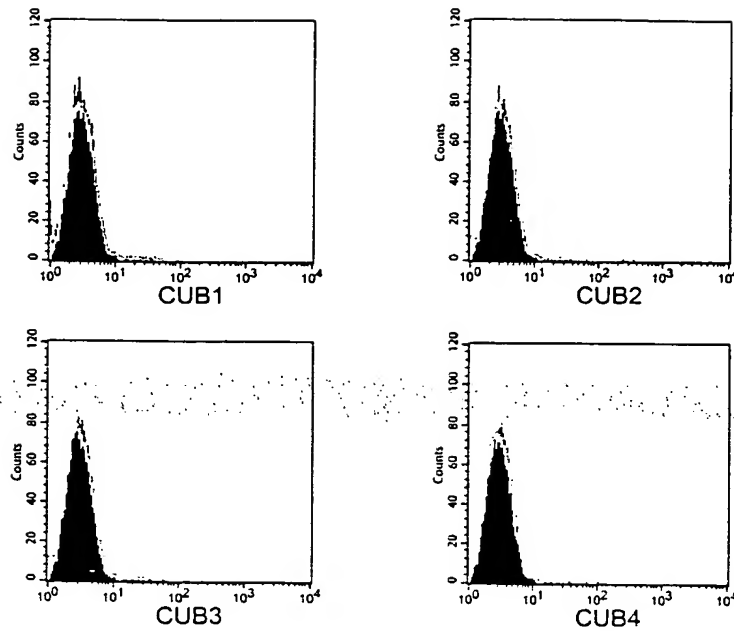


Fig. 1a

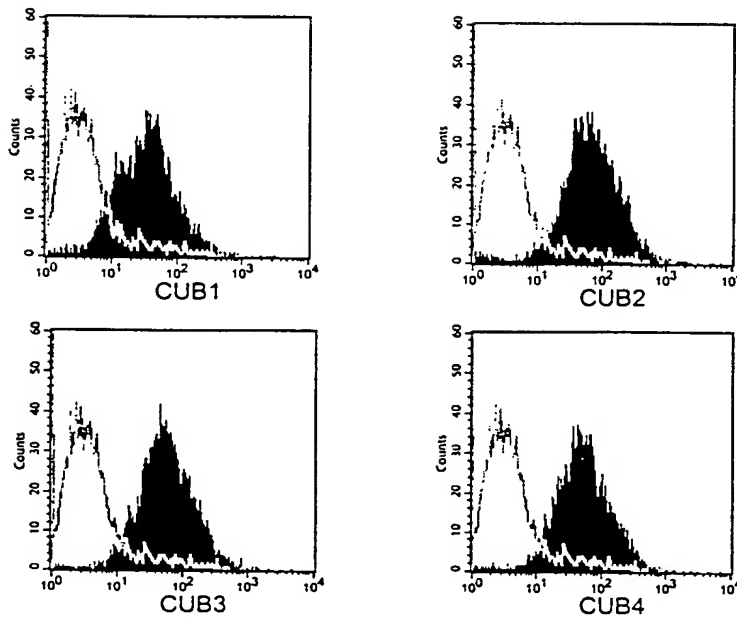


Fig. 1b

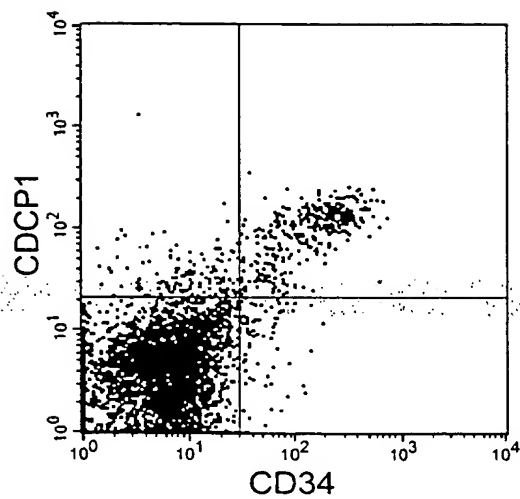


Fig. 2a

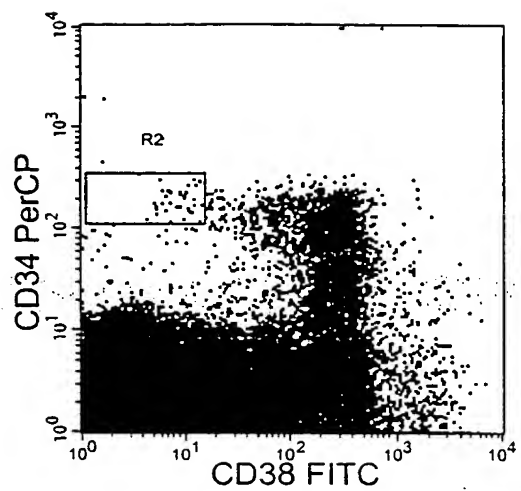


Fig. 2b

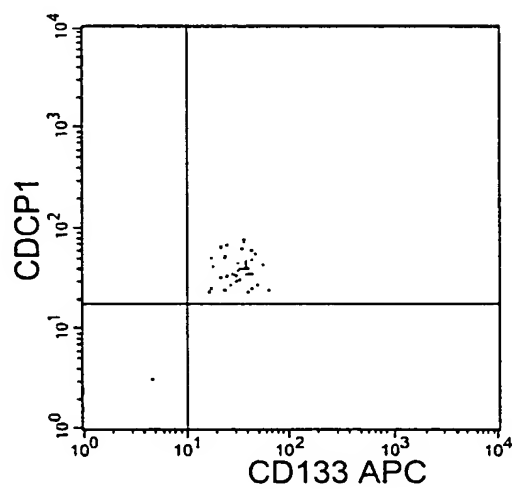


Fig. 2c